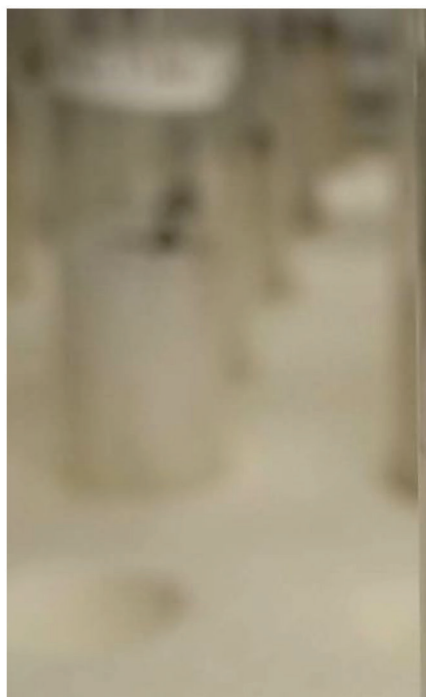


Desenvolvimento in vitro de Sementes Imaturas Provenientes de Cruzamentos Interespecíficos de *Psidium* spp.



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Semiárido
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
141**

**Desenvolvimento in vitro de Sementes Imaturas
Provenientes de Cruzamentos Interespecíficos
de *Psidium* spp.**

*Juliana Martins Ribeiro
Carlos Antonio Fernandes Santos
Nataniel Franklin de Melo*

***Embrapa Semiárido
Petrolina, PE
2020***

Esta publicação está disponibilizada no endereço:
<http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>
Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

Embrapa Semiárido
BR 428, km 152, Zona Rural
Caixa Postal 23
CEP 56302-970, Petrolina, PE
Fone: (87) 3866-3600
Fax: (87) 3866-3815

Comitê Local de Publicações

Presidente
Flávio de França Souza

Secretária-Executiva
Juliana Martins Ribeiro

Membros
Ana Cecília Poloni Rybka, Bárbara França Dantas, Diogo Denardi Porto, Élder Manoel de Moura Rocha, Geraldo Milanez de Resende, Gislene Feitosa Brito Gama, José Maria Pinto, Pedro Martins Ribeiro Júnior, Rita Mércia Estigarribia Borges, Sidinei Anunciação Silva, Tadeu Vinhas Voltolini.

Supervisão editorial
Sidinei Anunciação Silva

Revisão de texto
Killiane Maria de Avila Sant'Anna e Rodrigues

Normalização bibliográfica
Sidinei Anunciação Silva

Tratamento das ilustrações
José Clétis Bezerra

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
José Clétis Bezerra

Foto da capa
Juliana Martins Ribeiro

1ª edição: 2020

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Semiárido

Ribeiro, Juliana Martins.

Desenvolvimento in vitro de sementes imaturas provenientes de cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp. / Juliana Martins Ribeiro, Carlos Antonio Fernandes dos Santos, Nataniel Franklin de Melo. -- Petrolina: Embrapa Semiárido, 2020.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.
ISSN 1808-9968.

1. Goiabeira. 2. Araçazeiro. 3. Cultivo in vitro. 4. Melhoramento genético. 5. Germinação. I. Ribeiro, Juliana Martins. II. Santos, Carlos Antonio Fernandes. III. Melo, Nataniel Franklin de. IV. Título. V. Série.

CDD 571.5

Sumário

Resumo5

Abstract6

Introdução.....7

Material e Métodos8

Resultados e Discussão9

Conclusões.....17

Agradecimentos.....17

Referências17

Desenvolvimento in vitro de sementes imaturas provenientes de cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp.

Juliana Martins Ribeiro¹

Carlos Antonio Fernandes Santos²

Natoniel Franklin de Melo³

Resumo - A produção de goiaba no Nordeste brasileiro, principalmente no Submédio do Vale do São Francisco, apresenta destaque nacional. Porém, a ocorrência de problemas fitossanitários relacionados ao ataque do nematoide *Meloidogyne enterolobii* tem prejudicado a produção da cultura e inviabilizado várias áreas de cultivo. A identificação de fontes de resistência por meio da obtenção e seleção de progênies resistentes/tolerantes a *M. enterolobii* por hibridação artificial e o resgate de embriões resultantes de cruzamentos interespecíficos poderão contribuir para a geração de novas cultivares de copa ou porta enxertos resistentes ao nematoide. Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi realizar o desenvolvimento de sementes imaturas resultantes de cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp. Para tal propósito, sementes imaturas de frutos abortados aproximadamente aos 10, 20 e 40 dias após os cruzamentos interespecíficos entre *Psidium guajava* e *Psidium friedrichstalianum* foram introduzidas in vitro para a avaliação do seu desenvolvimento. Foi observado que há uma correlação direta entre o tempo de abortamento dos frutos e a viabilidade dos embriões. Nesse caso, embriões de sementes imaturas de frutos abortados cerca de 10 dias após o cruzamento não sobreviveram in vitro por mais de 30 dias, ficando totalmente oxidados. As sementes imaturas de frutos abortados cerca de 20 dias após o cruzamento se mantiveram viáveis em meio de cultura, mas sem que ocorresse a germinação. Entretanto, sementes imaturas de frutos abortados aproximadamente aos 40 dias após o cruzamento puderam ser germinadas in vitro, resultando do desenvolvimento completo de uma planta.

Termos para indexação: goiabeira, araçazeiro, cultivo in vitro, melhoramento genético.

¹ Bióloga, D.Sc. em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

² Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

³ Biólogo, D.Sc. em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE

In vitro development of immature seeds from interspecific crosses of *Psidium* spp.

Abstract - The production of guava in the Brazilian Northeast, mainly in the Sub-Middle of the São Francisco River Valley, have national prominence. However, the occurrence of phytosanitary problems related to the attack of the nematode *Meloidogyne enterolobii* has impaired the production of the crop and made unviable several areas of cultivation. The identification of resistance sources by obtaining and selecting *M. enterolobii* resistant / tolerant progenies by artificial hybridization and the rescue of embryos resulting from interspecific crosses may contribute to the generation of new nematode resistant cultivars. In view of this, the objective of the present research was to perform the development of immature seeds resulting from interspecific crosses of *Psidium* spp. For this purpose, immature seeds of aborted fruits at 10, 20 and 40 days after interspecific crosses between *Psidium guajava* and *Psidium friedrichstalianum* were introduced in vitro to evaluate their development. It was observed that there is a direct correlation between the time of abortion of the fruits and the viability of the embryos. In this case, immature seed embryos of fruits aborted 10 days after crossing did not survive in vitro for more than 30 days, being totally oxidized. The immature seeds of fruits aborted 20 days after the crossing remained viable in culture medium, but without germination. However, immature seeds of fruits aborted 40 days after crossing could be germinated in vitro, resulting on the development of a complete plant.

Index terms: guava, araçazeiro, in vitro culture, genetic improvement.

Introdução

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma importante cultura, principalmente, nas áreas irrigadas do Nordeste brasileiro, onde o manejo da poda possibilita a produção de frutos de alta qualidade em qualquer época do ano. Em 2016, o Nordeste apresentou a maior produção nacional de goiaba, com 191.078 toneladas de frutos, seguido pelo Sudeste, com 186.100 toneladas. Em relação à área colhida no ano de 2016, o Nordeste se destacou com 8.412 hectares, seguido pelo Sudeste, com 6.664 hectares. Entretanto, nesse mesmo ano, o estado de São Paulo foi o maior produtor nacional com maior área colhida, seguido pelo estado de Pernambuco (Agrianual, 2019). De acordo com o Anuário Brasileiro de Horti & Fruti (2019), em 2017, a produção nacional de goiaba foi de 460.515 toneladas.

A produção de goiaba no Nordeste brasileiro, principalmente no Submédio do Vale do São Francisco, apresenta destaque nacional. Porém, há alguns anos, a ocorrência de problemas fitossanitários tem prejudicado a produção da cultura e inviabilizado várias áreas de cultivo (Flori; Castro, 2009). Dentre os limitantes às maiores produções da cultura, os nematoides do gênero *Meloidogyne* foram detectados em goiabeiras cultivadas no Nordeste brasileiro (Moura; Moura, 1989).

A identificação de fontes de resistência por meio da obtenção e seleção de progênies resistentes/tolerantes a *Meloidogyne enterolobii* por hibridação artificial (Souza et al., 2018), bem como o resgate de embriões resultantes de cruzamentos interespecíficos, contribuirão para a geração de novas cultivares para serem utilizadas como porta enxertos resistentes ao nematoide.

O resgate de embriões de *Psidium* spp. a partir de sementes imaturas tem sido realizado, principalmente, por meio de embriogênese somática (Ghaffoor; Alderson, 1994; Guerra et al., 2001; Rai et al., 2007; Moura; Motoike, 2010; Akhtar, 2010; Bajpai et al., 2016). Informações sobre a germinação de embriões e o desenvolvimento in vitro de plântulas a partir de sementes imaturas de *Psidium* spp. são escassas.

Frente à importância do problema do nematoide-das-galhas da goiabeira e à carência de informações sobre o tema, esta pesquisa teve como objetivo realizar o desenvolvimento de sementes imaturas provenientes de cruzamen-

tos interespecíficos de *Psidium* spp., visando superar a incompatibilidade genética entre as espécies.

Material e Métodos

Frutos imaturos, abortados aproximadamente aos 10, 20 e 40 dias após os cruzamentos interespecíficos entre *P. guajava* e *Psidium friedrichstalianum*, foram levados do Campo Experimental de Bebedouro (09°09' S e 40°22' W e altitude de 365,5 m) para o laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido e mantidos em geladeira (6 °C a 10 °C) por aproximadamente três dias. Sua desinfestação foi realizada no interior da capela de fluxo laminar em solução de 0,1% de hipoclorito de sódio por 30 minutos, seguida de três enxágues em água deionizada autoclavada. Foi utilizado como explante o conjunto de sementes imaturas presentes na parte interna de frutos não oxidados (com coloração externa verde) abortados após os cruzamentos. Os explantes foram extraídos com o auxílio de pinças e bisturis estéreis e, posteriormente, introduzidos em tubos de ensaio medindo 2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura, contendo 10 mL de meio de cultura.

O meio utilizado para a germinação das sementes imaturas foi composto pela formulação de sais inorgânicos WPM (Lloyd; McCown, 1980), vitaminas de White (1943), 0,002 g L⁻¹ de glicina, 0,1 g L⁻¹ de inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar, 1,0 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), sendo o pH aferido para 5,9 e o meio esterilizado por autoclavagem (121 °C e 1 kg cm² durante 20 minutos). Para a indução de raízes e manutenção das culturas in vitro, utilizou-se o meio de cultura com formulação de sais inorgânicos DKW (Driver; Kuniyuki, 1984), vitaminas de White (1943), 0,002 g L⁻¹ de glicina, 0,1 g L⁻¹ de inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar, sem reguladores de crescimento, sendo o pH aferido para 5,9 e o meio esterilizado por autoclavagem (121 °C e 1 kg cm² durante 20 minutos).

Algumas estratégias foram adotadas para tentar contornar ou diminuir a oxidação das sementes, sendo elas: 1) a adição de 0,1 g L⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidona) ao meio de cultura; 2) a imersão dos explantes em solução filtrada de ácido ascórbico nas concentrações de 100 e 200 mgL⁻¹; e 3) a adição de 3 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura associado a 0,1 g L⁻¹ de PVP. Além disso, nos primeiros 30 dias de cultivo in vitro, os explantes foram

recultivados semanalmente visando diminuir o contato destes com os compostos fenólicos liberados no meio de cultura. Os meios de cultura nos quais houve a adição do carvão ativado tiveram as concentrações dos reguladores de crescimento aumentadas, devido às propriedades de grande absorção de moléculas do carvão ativado. Nesse caso, a concentração do BAP passou de 1,0 para 10,0 mg L⁻¹.

Sementes imaturas extraídas de frutos abortados cerca de 10 dias após os cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp. foram imersas em solução filtrada de ácido ascórbico, nas concentrações de 100 e 200 mgL⁻¹, e inoculadas em meio de cultura contendo apenas 0,1 g L⁻¹ de PVP. Sementes imaturas extraídas de frutos abortados 20 e 40 dias após os cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp. foram inoculadas em meio de cultura contendo 0,1 g L⁻¹ de PVP e 3 g L⁻¹ de carvão ativado.

Após a introdução no meio de cultura adequado, o material foi mantido por cerca de 68 dias na ausência de luz em sala de crescimento e temperatura de 27 ± 2 °C e, em seguida, transferido para uma condição luminosa (radiação fotossintética ativa de 40 µmol.m⁻²s⁻¹) com fotoperíodo de 16 horas nas mesmas condições.

Resultados e Discussão

Os resultados indicaram que a idade dos explantes e o processo de oxidação foram os fatores que mais influenciaram a resposta in vitro de *Psidium* spp. (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de explantes germinados e que formaram calos após o cultivo in vitro.

| Idade dos explantes (dias) | Explantes introduzidos in vitro | Explantes germinados | Explantes com formação de calos |
|----------------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| 1 a 13 | 16 | 0 | 0 |
| 14 a 20 | 29 | 0 | 13 (44,82%) |
| 40 | 1 | 1 (100%) | 0 |

Mesmo aqueles explantes que apresentaram alguma resposta *in vitro*, seja para a germinação ou formação de calos, ainda possuíam algumas partes oxidadas, as quais foram gradualmente eliminadas a cada troca do meio de cultura. Sementes imaturas de frutos abortados aproximadamente aos 10 dias após os cruzamentos entre *P. guajava* (goiabeira 'Paluma') e *P. friedrichstalianum* (araçazeiro 'Costa Rica') já se apresentaram totalmente oxidadas ainda no interior dos frutos (Figura 1A), oxidando no mesmo dia ou pouco tempo após sua introdução no meio de cultura (Figura 1B). A adição do PVP ao meio de cultura e imersão dos explantes em solução de ácido ascórbico nas concentrações de 100 mg L⁻¹ e 200 mg L⁻¹ não foram eficientes para controlar a oxidação dos explantes com essa idade.

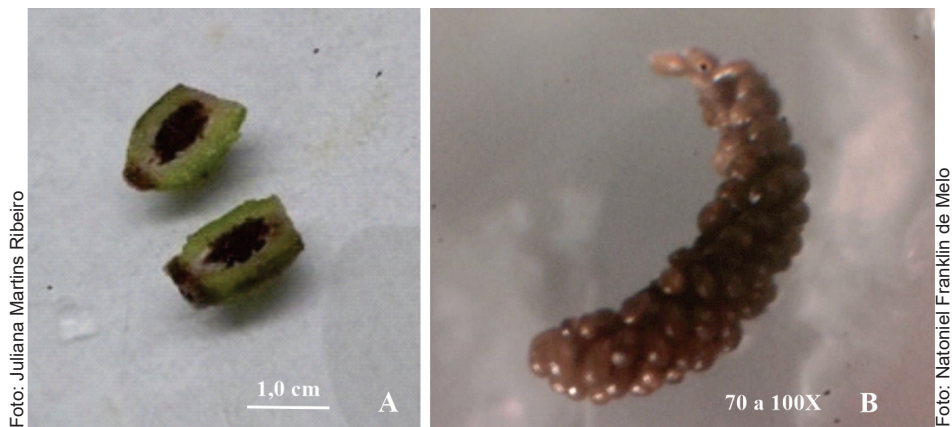


Figura 1. Oxidação de sementes imaturas de fruto abortado cerca de 10 dias após os cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp. A) Fruto com oxidação total em seu interior e B) sementes imaturas oxidadas, extraídas de um fruto abortado, 30 dias após sua introdução no meio de cultura.

O processo de oxidação pode ser desencadeado pela lesão física do tecido vegetal, fazendo com que a atividade das enzimas relacionadas com o estresse oxidativo aumente no local e, conseqüentemente, ocorra a degradação oxidativa de compostos fenólicos, resultando no aparecimento de substâncias escuras (Agrios, 2005). Além disso, altas concentrações de compostos fenólicos possuem efeito inibitório no desenvolvimento dos explantes *in vitro* (Kerbaui, 2004). Explantes de goiabeira exsudam compostos fenólicos no meio de cultura, os quais dificultam o processo de regeneração das plantas,

podendo ocasionar sua morte em até dois dias após sua introdução no meio de cultura (Singh; Singh, 2018).

Tanto o abortamento do fruto, quanto sua abertura com a utilização de lâminas, causam lesão física no tecido, desencadeando a oxidação. A atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo foi verificada anteriormente em *P. guajava* (goiabeira 'Paluma') e *P. friedrichstalianum* (araçazeiro 'Costa Rica') (Ribeiro et al., 2015). A medição detectou cerca de 600 unidades de atividade da polifenoloxidase por miligrama de proteína de tecido (UA/mg) em araçazeiro 'Costa Rica' e aproximadamente 100 UA/mg em goiabeira 'Paluma'. Para a peroxidase, foi verificado cerca de 150 unidades de atividade por miligrama de proteína (UA/mg) em araçazeiro 'Costa Rica' e aproximadamente 100 UA/mg em goiabeira 'Paluma' (Ribeiro et al., 2015). Ambas as espécies citadas foram utilizadas no resgate de embriões, justificando a elevada quantidade de explantes oxidados in vitro.

Conforme mencionado, a adição de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de PVP ao meio de cultura e a imersão dos explantes em solução de ácido ascórbico nas concentrações de 100 e 200 mg L^{-1} , não foram eficientes para controlar o processo de oxidação em explantes extraídos dos frutos abortados cerca de 10 dias após os cruzamentos. Frente a esta situação, explantes extraídos dos frutos abortados aproximadamente aos 20 dias após os cruzamentos foram introduzidos em meio de cultura com $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de PVP e 3 g L^{-1} de carvão ativado. Observou-se uma redução na perda de explantes por oxidação (Tabela 1), tendo sido a adição do carvão ativado ao meio de cultura eficiente em controlar o processo de oxidação dos explantes com essa idade.

O carvão ativado tem como função adsorver substâncias do meio de cultura, incluindo fenóis (Thomas, 2008). O uso do carvão ativado tem sido amplamente utilizado para o cultivo in vitro de diferentes espécies, como a tamareira (El-Bahr et al., 2016; Zayed et al., 2016), bananeira (Ngomuo et al., 2014; Safwat et al., 2015), orquídea (Prizão et al., 2012), tomate (Rodrigues et al., 2017) entre outras, visando o controle da oxidação e, em alguns casos, a indução de multiplicação e enraizamento in vitro.

Ao contrário das sementes imaturas de frutos abortados cerca de 10 dias após os cruzamentos, aquelas extraídas de frutos abortados aproximadamente aos 20 dias após os cruzamentos entre *P. guajava* (goiabeira 'Paluma') e *P. friedrichstalianum* (araçazeiro 'Costa Rica') sobreviveram por mais de

30 dias *in vitro* (Tabela 1). Foi possível a manutenção de sementes imaturas *in vitro* cerca de 70 (Figura 2A) e 180 (Figura 2B) dias após sua inoculação no meio de cultura, na ausência de luz. Entretanto, não houve a germinação e desenvolvimento de plântulas a partir de sementes imaturas extraídas de frutos abortados cerca de 20 dias após os cruzamentos.

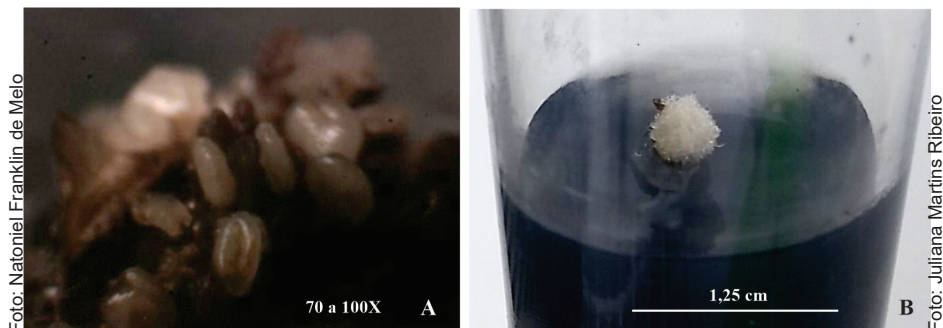


Figura 2. Sementes imaturas de fruto abortado cerca de 20 dias após os cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp. Desenvolvimento dos explantes: A) 68 dias após a inoculação no meio de cultura, cultivadas na ausência de luz e B) 177 dias após a inoculação no meio de cultura, na ausência de luz.

Quanto às sementes imaturas extraídas de frutos abortados cerca de 40 dias após os cruzamentos entre *P. guajava*, (goiabeira ‘Pedro Sato’) e *P. friedrichstalianum* (araçazeiro ‘Costa Rica’), assim como aquelas oriundas de frutos abortados aproximadamente aos 20 dias após os cruzamentos, sobreviveram por mais de 30 dias *in vitro* e tiveram uma menor perda por oxidação, tendo sido a adição do carvão ativado ao meio de cultura eficiente em diminuir esse processo. Entretanto, ao contrário dos resultados observados nas sementes imaturas de frutos abortados aproximadamente aos 20 dias após os cruzamentos, aquelas extraídas de frutos abortados cerca de 40 dias após os cruzamentos germinaram, resultando na formação de uma plântula *in vitro*. Observou-se a germinação do embrião a partir da semente imatura, com o aparecimento dos cotilédones, cerca de 60 dias após sua inoculação no meio de cultura (Figura 3A), até o desenvolvimento de uma plântula completa (Figuras 3B, 3C e 3D).

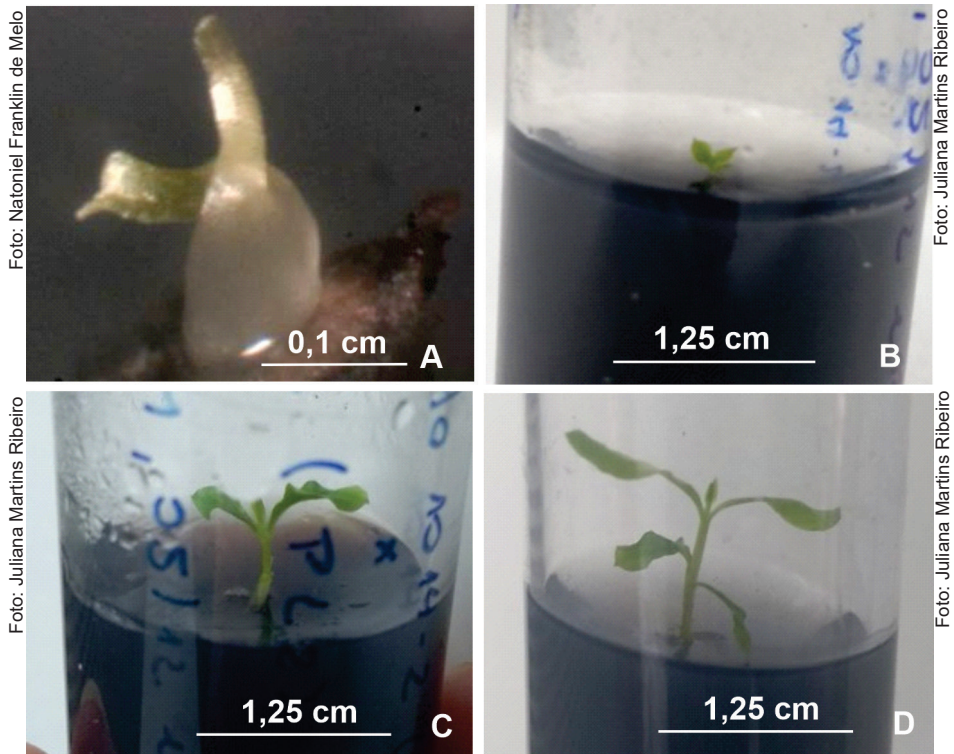


Figura 3. Desenvolvimento in vitro de planta partir de sementes imaturas extraídas de fruto abortado cerca de 40 dias após os cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp. Desenvolvimento do explante: A) 62 dias após a inoculação no meio de cultura; B) 80 dias após a inoculação no meio de cultura, C: 102 dias após a inoculação no meio de cultura e D) 120 dias após a inoculação no meio de cultura.

De maneira geral, a germinação in vitro de diferentes espécies e cultivares de goiabeira são realizadas a partir de sementes imaturas ou embriões zigóticos mais desenvolvidos do que aqueles utilizados nessa pesquisa. Guerra et al. (2001) utilizaram como explantes para a indução de embriogênese somática em goiabeira Serrana (*Feijoa sellowiana*), sementes de frutos coletados 135 dias após a antese. Rai et al. (2009) realizaram a multiplicação de brotos e a regeneração de plantas de goiabeira (*P. guajava*) a partir de embriões zigóticos extraídos de frutos coletados 10 semanas após a antese. Moura e Motoike (2009) induziram embriogênese somática em 'Paluma' a partir de sementes imaturas de frutos coletados 50 dias após a antese. Akhtar (2010)

avaliou a embriogênese somática em 'Allahabad Safeda', a partir de embriões zigóticos isolados de frutos coletados 10 semanas após a antese. Bajpai et al. (2016) induziram a embriogênese somática e a regeneração de plantas a partir de embriões zigóticos isolados de frutos de goiabeira (*P. guajava*) coletados 70 dias após a antese. Estas informações podem justificar o fato de os frutos abortados até 20 dias após os cruzamentos não terem respondido ou não terem germinado plantas completas in vitro.

A composição do meio de cultura, especialmente em relação aos sais inorgânicos e reguladores de crescimento vegetais utilizados, também influencia diretamente o padrão de desenvolvimento in vitro. Os reguladores de crescimento vegetais geram efeitos marcantes no desenvolvimento in vitro das plantas, mesmo em pequenas concentrações. As citocininas são reguladores de crescimento vegetais, sintetizados principalmente nos meristemas das raízes. Sua síntese também ocorre no embrião de sementes em desenvolvimento e em folhas e frutos jovens. São responsáveis, entre outras, pela indução de gemas ou de raízes na cultura de tecidos, quando aplicados em proporção adequada com auxina (Taiz; Zeiger, 2004).

O regulador de crescimento BAP é uma citocinina sintética que tem se mostrado eficiente na indução de brotos em diversas espécies lenhosas (Oliveira et al., 2016), além de proporcionar um menor custo de aquisição (Aragão et al., 2011). Corroborando com os resultados desta pesquisa, o BAP já foi utilizado de forma eficiente para a indução de brotações in vitro no cultivo de goiabeira. Rai et al. (2009) reportaram o uso de 1 mg L⁻¹ de BAP para a indução de brotos em gemas axilares desta espécie. Meghwal et al. (2010) utilizaram 1 mg L⁻¹ de BAP para a indução de brotos em segmentos nodais de 'Allahabad Safeda'. Bajpai et al. (2016) induziram brotações in vitro em plantas, obtidas a partir de embriões imaturos de 'Allahabad Safeda', adicionando 2 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura. Singh e Singh (2018) relataram que o BAP é o regulador mais comumente utilizado para a micropropagação de goiabeira.

Plântulas, germinadas e desenvolvidas a partir de sementes imaturas extraídas de frutos abortados cerca de 40 dias após os cruzamentos entre *P. guajava*, (goiabeira 'Pedro Sato') e *P. friedrichstalianum* (araçazeiro 'Costa Rica'), foram transferidas para o meio DKW, sem reguladores de crescimento, cerca de 130 dias após o cultivo em meio WPM adicionado de BAP. Após

42 dias de cultivo no meio DKW, observou-se o desenvolvimento de raízes e de novos brotos na plântula (Figura 4).

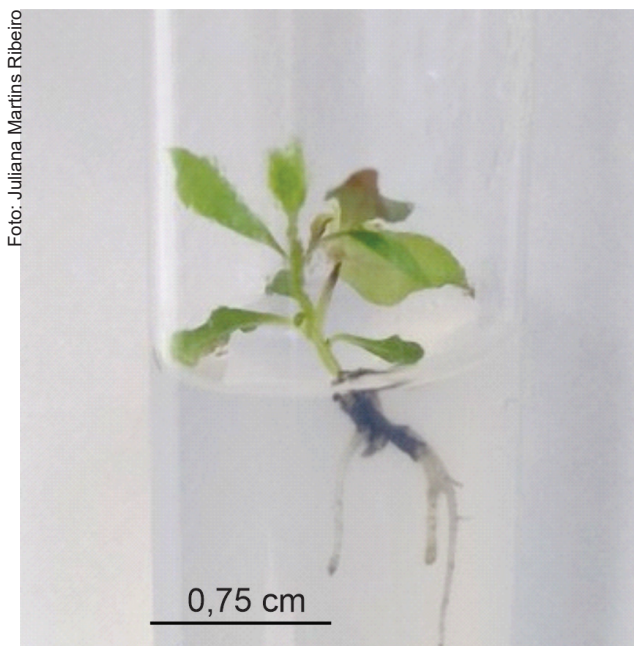


Figura 4. Desenvolvimento in vitro de plântula mantida por 42 dias em meio DKW sem reguladores de crescimento vegetal.

De maneira geral, meios de cultura com altas concentrações de sais dificultam o processo de enraizamento in vitro, mesmo com a adição de auxinas. Altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento, especialmente o crescimento das raízes (Centellas et al., 1999). Concentrações de sais no meio diminuídas para 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitam melhor enraizamento (Hu; Wang, 1983).

Para a maioria das espécies vegetais, a utilização do meio com formulação de sais inorgânicos de MS (Murashige; Skoog, 1962) tem se mostrado satisfatória para o cultivo in vitro. Entretanto, formulações especialmente desenvolvidas para espécies lenhosas, com redução do teor de macronutrientes, como por exemplo, o meio WPM, têm sido descritas e utilizadas

frequentemente como alternativa ao meio MS (Melo et al., 1999; Bertozzo; Machado, 2010).

Por outro lado, apesar de os macronutrientes inibirem o enraizamento in vitro quando em excesso no meio de cultura, diluições excessivas desses nutrientes podem levar a deficiências minerais na planta (Grattapaglia; Machado, 1990), podendo afetar seu desenvolvimento, principalmente, pela limitação do nitrogênio. O nitrogênio (N) é o principal macronutriente para as plantas, e pode ser absorvido tanto na forma catiônica (NH_4^+) como aniônica (NO_3^-). É responsável pelo crescimento da planta, desenvolvimento do sistema radicular, atua diretamente na fotossíntese e, conseqüentemente, é responsável pela coloração verde das folhas. Também é parte constituinte da clorofila, vitaminas, carboidratos e proteínas. É, frequentemente, considerado o mais importante fator, após a deficiência de água, limitante do crescimento vegetal (Chapin III, 1980; Heinrichs et al., 2006)

O meio DKW possui formulação intermediária entre o meio MS e o WPM em relação a concentração de nitrato de amônio (NH_4NO_3), sendo 20,6 mM no MS, 17,68 mM no DKW e 4,9 mM no WPM. A escolha do meio DKW para o enraizamento e manutenção das culturas in vitro foi visando uma condição que não interferisse no enraizamento pelo excesso desse macronutriente, e que também não prejudicasse o desenvolvimento da planta pela sua carência. O meio DKW já foi utilizado de forma eficiente para a micropropagação de espécies lenhosas. Melo et al. (1999) reportaram que os meios WPM e DKW favoreceram um maior número de brotações no cultivo in vitro de genótipos de aceroleira. Para o estabelecimento de oliveira 'Koroneiki' foi observado que os explantes apresentaram melhores respostas in vitro quando cultivados por 1 mês em meio DKW modificado (Roussos; Pontikis, 2002). Yildirim (2012) obtiveram brotos com maiores comprimentos médios quando utilizaram o meio DKW para o cultivo in vitro de *Pistacia lentiscus* L. Para o estabelecimento in vitro de *Cornus wilsoniana*, Li et al. (2015) utilizaram o meio DKW adicionado de 0.5 mg L⁻¹ de Zeatina e 0.1 mg L⁻¹ de AIB (ácido indol butírico) para indução de brotações, e DKW contendo 1.0 mg L⁻¹ AIB para a indução de raízes nos explantes.

Conclusões

A adição do carvão ativado ao meio de cultura e trocas iniciais de meio em intervalos menores que uma semana são importantes para contornar os problemas relacionados com a oxidação dos explantes in vitro.

Sementes imaturas de frutos abortados com intervalo inferior a 10 dias após o cruzamento não sobrevivem in vitro por mais de 30 dias em meio de cultura, ficando totalmente oxidadas.

Sementes imaturas de frutos abortados cerca de 20 dias após o cruzamento podem se manter viáveis em meio de cultura, mas sem que ocorra a germinação e desenvolvimento de plântulas.

Sementes imaturas de frutos abortados aproximadamente aos 40 dias após o cruzamento podem ser germinadas e resultar no desenvolvimento de plântulas in vitro.

O BAP induz a germinação de embriões e a formação de brotos a partir de sementes imaturas extraídas de frutos abortados cerca de 40 dias após o cruzamento.

Meio DKW, sem adição de reguladores vegetais, é eficiente para indução do enraizamento de plântulas provenientes de sementes imaturas extraídas de frutos abortados aproximadamente aos 40 dias após o cruzamento.

Agradecimentos

À Embrapa Semiárido e ao CNPq pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Referências

- AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2019.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. Cambridge: Academic Press, 2005. 922 p.
- AKHTAR, N. Evaluation of the efficiency of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.), **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.85, n. 6, p. 556-562, 2010.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2019. Disponível em: http://www.abcsem.com.br/upload/arquivos/HortiFruti_2019_DUPLA.pdf. Acesso em: 18 mar. 2020.

- ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. do A. Efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, v. 17, p. 339-345, 2011.
- BAJPAI, A.; KALIM, S.; CHANDRA, R.; KAMLE, M. Recurrent somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Psidium guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150170>.
- BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, Dec. 2010.
- CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. de L.; MÜLLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 181-186, fev. 1999.
- CHAPIN III, F. S. The mineral nutrition of wild plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, p. 233-60, 1980.
- DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. In vitro propagation of paradox walnut root stock. **HortScience**, v. 19, p. 507-509, 1984.
- EL-BAHR, M. K.; EL-HAMID, A.; MATTER, M. A.; SHALTOUT, A.; BEKHEET, S. A.; EL-ASHRY, A. A. In vitro conservation of embryogenic cultures of date palm using osmotic mediated growth agents. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, p. 363-370, 2016.
- FLORI, J. E.; CASTRO, J. M. C. A cultura da goiabeira irrigada no Nordeste brasileiro. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Ed.). **Cultura da goiaba do plantio à comercialização**. Jaboticabal: UNESP-FCAV, 2009. cap. 2, p. 507-524.
- GHAFFOOR, A.; ALDERSON, P. G. Somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). In: LUMSDEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVIES, W. J. (Ed.). **Physiology, growth and development of plants in culture**. Heidelberg: Springer, 1994. p. 272-277.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPq; ABCTP, 1990. p. 99-169.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.
- HEINRICHS, R.; GAVA, G. J.; CORAZZA, E. J.; DUETE, R. R. C.; VILLANUEVA, F. C. A.; MURAOKA, T. Forma preferencial de absorção de nitrogênio (15NH_4^+ ou 15NO_3^-) pelas culturas de soja, feijão, arroz e milho. **Cientifica**, v. 34, n. 1, p. 25-30, 2006.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.
- LI, Y.; WANG, X.; CHEN, J.; CAI, N.; ZENG, H.; QIAO, Z. A method for micropropagation of *Cornus wilsoniana*: an important biofuel plant. **Industrial Crops and Products**, v. 76, n. 15, p. 49-54, 2015.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagator Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

- MEGHWAL, P. R.; SHARMA, H. C.; SINGH, S. K. Micropropagation studies on guava. **Indian Journal of Horticulture**, v. 67, p. 55-58, 2010.
- MELO, N. F. de; OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo in vitro da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 1, p. 102-107, 1999.
- MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y. Induction of somatic embryogenesis in immature seeds of guavatee cv. Paluma. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 507-511, 2009.
- MOURA, R. M.; MOURA, A. M. Meloidoginose da goiabeira: doença de alta severidade no Estado de Pernambuco, Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 13, p. 13-19, 1989.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NGOMUO, M.; MNENEY, E.; NDAKIDEMI, P. A. The in vitro propagation techniques for producing banana using shoot tip cultures. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 11, p. 1614-1622, 2014.
- OLIVEIRA, K. S.; FREIRE, F. A. de M.; ALOUFA, M. A. I. Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação in vitro de *Hancornia speciosa* Gomes. **Floresta**, v. 46, n. 3, p. 335-342, 2016.
- PRIZÃO, E. C.; GONÇALVES, L. de M.; GUTIERRE, M. A. M.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. de F. P. da S. Activated charcoal and graphite for the micropropagation of *Cattleya bicolor* Lindl. and a orchid double-hybrid 'BLC Pastoral Innocence.' **Maringá**, v. 34, n. 2, p. 157-161, 2012.
- RAI, M. K.; AKHTAR, N.; JAISWAL, V. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. **Scientia Horticulturae**, v. 113, n. 2, p. 129-133, 2007.
- RAI, M. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of in vitro raised plantlets. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 17, n. 1, p. 29-38, 2009.
- RIBEIRO, J. M.; PINTO, M. dos S. T.; CASTRO, J. M. da C. e; MELO, N. F. de; FERNANDES, K. V. S. **Atividade de peroxidases e polifenoloxidasas em Psidium spp. resistentes e suscetíveis a Meloidogyne enterolobii**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2015. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 122). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/141646/1/BPD122Juliana.pdf>. Acesso em: 5 jun. 2020.
- RODRIGUES, F. A.; REZENDE, R. A. L. S.; PASQUAL, M.; LOPES, M. T. G. Solidifying agents and activated charcoal for in vitro culture of *Solanum sessiliflorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 11, p. 1123-1126, 2017.
- ROUSSOS, P. A.; PONTIKIS, C. A. In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. **Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 295-304, 2002.
- SAFWAT, G.; ABDUL-RAHMAN, F.; EL SHARBASY, S. The effect of some antioxidants on blackening and growth of in vitro culture of banana (*Musa* spp. cv. Grand Naine). **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**, v. 44, p. 47-59, 2015.
- SINGH, K. K.; SINGH, S. P. A review: micropropagation of guava (*Psidium* Spp.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4, p. 145-150, 2018.
- SOUZA, R. R. C. de; SANTOS, C. A. F. S.; COSTA, S. R. da. Field resistance to *Meloidogyne enterolobii* in a *Psidium guajava* × *P. guineense* hybrid and its compatibility as guava rootstock. **Fruits**, v. 73, n. 2, p. 118-124, 2018.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 618-631, 2008.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, v.7, p. 53-65, 1943.

YILDIRIM, H. Micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. from axenic seedling-derived explants **Scientia Horticulturae**, v. 137, n.1, p.29-35, 2012.

ZAYED, E. M. M.; EL DIN, A. F. M. Z.; MANAF, H. H.; ABDELBAR. O. H. Floral reversion of mature inflorescence of date palm *in vitro*. **Annals of Agricultural Science**, v. 61, n. 1, p. 125-133, 2016.



Semiárido

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL